

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 10 月 23 日 (23.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/087365 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C12Q 1/02 (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号共同ビル Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/04761
- (22) 国際出願日: 2003 年 4 月 15 日 (15.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-112364 2002 年 4 月 15 日 (15.04.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-0027 東京都中央区日本橋 3 丁目 1 3 番 5 号 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 山添 康 (YAMAZOE, Yasushi) [JP/JP]; 〒981-0952 宮城県仙台市青葉区中山 五丁目 1 8-1-2 0 6 Miyagi (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 永田 清 (NAGATA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒981-0952 宮城県仙台市青葉区中山 五丁目 1 8-8-4 0 5 Miyagi (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF MEASURING HUMAN CYP3A INDUCIBILITY

(54) 発明の名称: ヒト CYP3A 誘導能の測定法

(57) Abstract: A method of measuring human CYP3A inducibility at the administration of a test drug characterized by comprising, to a non-human animal to which the test drug has been administered or cultured human cells having been cultured in a medium containing the test drug, transferring (A) a virus constructed by implanting a detectable reporter gene and at least 3 sites of regions capable of binding to human PXR in the non-translation region of human CYP3A gene into an adenovirus vector, and (B) a virus constructed by implanting human PXR gene into an adenovirus vector, and then measuring the expression dose of the reporter gene in the non-human animal or the cultured human cells. According to this method, the human CYP3A inducibility at the administration of a test drug to humans can be conveniently and accurately evaluated, which makes it possible to accurately evaluate the efficacy of the test drug, the expression of its side effect, the disappearance of the drug effect, etc.

(57) 要約: 被検薬物を投与された非ヒト動物又は被検薬物含有培地で培養されたヒト培養細胞に、(A) アデノウイルスベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒト CYP3A 遺伝子の非翻訳領域中のヒト PXR に結合する領域の少なくとも 3 ヶ所以上を組み込んでなるウイルス、及び (B) アデノウイルスベクターにヒト PXR 遺伝子を組み込んでなるウイルスを導入し、当該非ヒト動物又はヒト培養細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を測定することとを特徴とする、被検薬物投与時のヒト CYP3A 誘導能の測定法。本発明方法によれば、ヒトに被検薬物を投与したときのヒト CYP3A 誘導能が簡便かつ正確に評価できることから、当該薬物の有効性、副作用の発現、薬効の消失等が正確に評価できる。

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/087365 A1

Rec'd PCT/PTO 14 OCT 2004

明 細 書

ヒトCYP3A誘導能の測定法

技術分野

本発明は、ヒト型薬物代謝酵素であるヒトCYP3Aの誘導能を簡便かつ正確に測定する方法及び測定試薬に関する。

背景技術

ヒトに投与された種々の薬物は、肝臓等において種々の代謝を受ける。かかる薬物代謝に関与する酵素のうちシトクロムP450、特にCYP3Aは、薬物の有効性、副作用の発現、薬効の消失に最も影響を与える酵素であり、薬物投与時のCYP3A誘導能の測定は医薬品開発上必須の項目となっている。そして、当該CYP3A誘導能は、薬物固有の特性であり、薬物毎に測定し評価する必要がある。

従来のCYP3A誘導能の測定手段としては、ヒトCYP3Aの誘導能を測定するのではなく、ラットにおけるCYP3AであるCYP3A1又はCYP3A2の誘導能を測定することにより行われている。しかし、ヒトとラット等の動物では薬物に対する酵素の作用が異なり、ヒトにおける薬物動態が正確に評価できなかった。

従って本発明は、薬物投与時のヒトCYP3A誘導能を簡便かつ正確に測定する方法を提供することを目的とする。

発明の開示

そこで本発明者は、アデノウイルスベクターにレポーター遺伝子と、ヒト核内レセプターPXR (Pregnane X Receptor) 遺伝子を組み込んだウイルスを用いてマウスにおけるヒトCYP3A誘導能を測定したところ、良好な測定系が構築できることを見出した。そしてさらに研究を進めたところ、(A) アデノウイルスベクター

に、レポーター遺伝子とヒトPXR結合領域の少なくとも3ヶ所以上とを組み込んだウイルス、及び（B）アデノウイルスベクターにヒトPXR遺伝子を組み込んだウイルスの2つのウイルスを導入したヒト培養細胞系（in vitro）又は非ヒト動物（in vivo）でレポーターアッセイを行えば、従来法及び単一プラスミドを用いる方法に比べて飛躍的に正確にヒトCYP3A誘導能が測定できることを見出した。また、（a）プラスミドベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるDNAを導入したヒト培養細胞の中には、継代培養してもその形質を保持している形質転換細胞が存在し、これを用いればインビトロにおけるヒトCYP3A誘導能の測定が更に容易になることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、被検薬物を投与された非ヒト動物又は被検薬物含有培地で培養されたヒト培養細胞に、（A）アデノウイルスベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるウイルス、及び（B）アデノウイルスベクターにヒトPXR遺伝子を組み込んでなるウイルスを導入し、当該非ヒト動物又はヒト培養細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を測定することを特徴とする、被検薬物投与時のヒトCYP3A誘導能の測定法を提供するものである。

また本発明は、（a）プラスミドベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるDNAを導入してなる形質転換ヒト培養細胞を、被検薬物含有培地で培養し、レポーター遺伝子の発現量を測定することを特徴とする、被検薬物投与時のヒトCYP3A誘導能の測定法を提供するものである。

また本発明は、（A）アデノウイルスベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるウイルス、及び（B）アデノウイルスベクターにヒト

PXR遺伝子を組み込んでなるウイルスを含有することを特徴とするヒトCYP3A誘導能測定試薬を提供するものである。

さらに本発明は、(a) プラスミドベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるDNAを導入してなる形質転換ヒト培養細胞を含有することを特徴とするヒトCYP3A誘導能測定試薬を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、ウイルス(A) (AdCYP3A4-362-7K)ウイルスの作製手順を示す図である。

図2は、ウイルス(B) (AdhPXR)ウイルスの作製手順を示す図である。

図3は、培養細胞を用いたレポーター活性測定の手順を示す図である。

図4は、実動物を用いたレポーター活性測定の手順を示す図である。

図5は、培養細胞にAdCYP3A4-362ウイルスを感染させた場合のレポーター活性への薬物の影響を示す図である(DMSO:ジメチルスルホキシド、DEX:デキサメサゾン、RIF:リファンピシン、CL0:クロトリマゾール、濃度:10 μ M)。

図6は、ウイルス(B) (AdhPXR)およびウイルス(A) (AdCYP3A4-362-7K)を培養細胞に同時感染した場合のレポーター活性への薬物の影響を示す図である(DMSO:ジメチルスルホキシド、DEX:デキサメサゾン、RIF:リファンピシン、CL0:クロトリマゾール、濃度:10 μ M)。

図7は、AdCYP3A4-362を投与したマウス肝におけるレポーターおよびテストステロン6 β -水酸化活性への薬物の影響を示す図である(DEX:デキサメサゾン、RIF:リファンピシン、CL0:クロトリマゾール、投与量:100mg/kg/day \times 3)。

図8は、ウイルス(B) (AdhPXR)をマウスに同時投与した場合のAdCYP3A4-362ウイルス(A) (AdCYP3A4-362-7K)による転写誘導率の比較を示す図である(CL0:クロトリマゾール、Cont:コントロール、投与量:100mg/kg/day \times 3)。

図9は、ウイルス(B)(AdhPXR)投与によるマウスCYP3A誘導のヒト化を示す図である(RIF:リファンピシン、Cont:コントロール、投与量:100mg/kg/day×3)。

図10は、ウイルス(A)(AdCYP3A4-362-7K)とウイルス(B)(AdhPXR)を同時投与したマウスの肝に発現するレポーター活性への薬物の影響を示す図である(DEX:デキサメサゾン、RIF:リファンピシン、CLO:クロトリマゾール、Cont:コントロール、投与量:100mg/kg/day×3)。

図11は、安定発現株の作製手順を示す図である。

図12は、DNA(a)を導入した形質転換細胞(安定発現株)を用いた場合のレポーター活性への薬物の影響を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のヒトCYP3A誘導能測定法においては、次の2つのウイルスが用いられる。

(A) アデノウイルスベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるウイルス〔ウイルス(A)〕。

(B) アデノウイルスベクターにヒトPXR遺伝子を組み込んでなるウイルス〔ウイルス(B)〕。

ウイルス(A)及びウイルス(B)に用いられるアデノウイルスベクターとしては、通常遺伝子治療用のベクターとして用いられているアデノウイルスベクターであってもよいが、真核細胞のプロモーターやエンハンサーを含まないもの、例えば初期遺伝子E1A・E1B遺伝子を欠損させたものが好ましい。市販のアデノウイルスベクターとしては、Ad5dIX又はAdEasyが挙げられる。

ウイルス(A)に用いられる検出可能なレポーター遺伝子としては、検出可能なタンパク又は酵素をコードする遺伝子であればよく、例えばGFP(Green

Fluorescent Protein) 遺伝子、GUS (β -Glucuronidase) 遺伝子、LUS (Lusiferase) 遺伝子、CAT (Chloramphenicol acetyl transferase) 遺伝子等が挙げられる。市販のレポーター遺伝子としてはGFP、LUS、CATが挙げられる。

ウイルス (A) に用いられるヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上としては、ヒトCYP3A4遺伝子の非翻訳領域中の7.7k(dNR-1)領域、362(ER-6)領域、7.6~7.4k(MIE)領域及び、7.3k領域から選ばれる3ヶ所以上が挙げられるが、7.7k領域、7.6~7.4k領域及び362領域が特に好ましい。本発明においては、このヒトPXRに結合する領域の3ヶ所以上を用いることが重要であり1ヶ所又は2ヶ所だけを用いた場合にはヒトCYP3A遺伝子の発現が十分でなく、ヒトCYP3A誘導能が正確に測定できない。

ここでヒトPXRは核内レセプターの一つPregnane X Receptor遺伝子であり、ヒトCYP3Aの発現に関与することが知られている。しかし、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の3ヶ所以上が、ヒトCYP3Aの発現に重要であることは知られていない。

またヒトCYP3Aとしては、ヒトCYP3A4、CYP3A5、CYP3A7及びCYP3A43が挙げられるが、CYP3A4が薬物代謝上最も重要であり、CYP3A4が好ましい。

ウイルス (A) の作製は、ヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上、例えば7.7k領域、7.6~7.4k領域及び362領域をLUC遺伝子の上流に連結したレポーターウイルスを作製し、これをアデノウイルスベクターのEIA・EIB遺伝子領域に挿入することにより行われる。

ウイルス (B) に用いられるヒトPXR遺伝子としては、ヒトPXR cDNAが挙げられる。

ウイルス (B) の作製は、例えばMolecular cloning(Maniatisetal)記載の方法に従って調製したヒトPXR遺伝子をアデノウイルスベクターのEIA・EIB遺伝子領域に挿入することにより行われる。

本発明においては、これらのウイルス (A) 及びウイルス (B) は、被検薬物

を投与された非ヒト動物、又は被検薬物含有培地で培養されたヒト培養細胞に導入する。ここで両ウイルスは、同時に機能するように導入する必要があるが、これらのウイルスを混合液として導入してもよいし、いずれか一方のウイルスを導入し、続いて他方のウイルスを導入して両ウイルスが同時に機能するようにしてもよい。

非ヒト動物としては、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、イヌ、サル等が挙げられるが、実験操作の点からラット、マウスが特に好ましい。これらの非ヒト動物への被検薬物の投与方法は、当該被検薬物の臨床における投与手段の他、腹腔内投与が挙げられる。また被検薬物の投与量は、臨床投与量を考慮して決定すればよい。当該ヒト動物へのウイルス（A）及び（B）の導入手段としては、腹腔内投与、静脈投与等により行うのが好ましい。

ヒト培養細胞としては、HepG2、LS174T、Hela、Caco-2等が挙げられるが、HepG2、LS174Tが特に好ましい。当該ヒト培養細胞は、そのまま、又は被検薬物を含む培地で培養したものが用いられる。当該ヒト培養細胞へのウイルス（A）及び（B）の導入は、培地にウイルスを添加する等により行うのが好ましい。

本発明のヒトCYP3A誘導能測定に用いられる形質転換ヒト培養細胞は、ヒト培養細胞に次のDNAを導入することにより得られる。

（a）プラスミドベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるDNA〔DNA（a）〕。

DNA（a）に用いられるプラスミドベクターとしては、マルチクローニングサイトを有するベクター、例えばpGL3 Basic Vector（promega社）、pDSRed 2-1などのGFP遺伝子を含むベクター（Clontech社）等が挙げられる。

DNA（a）に用いられる検出可能なレポーター遺伝子、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所としては、いずれも前記ウイルス（A）に用いられるものが採用できる。

DNA (a) の作製は、ヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上、例えば7.7k領域、7.6～7.4k領域及び362領域を連結したレポーターベクターを作製し、これをレポーター遺伝子を有するプラスミドベクターのマルチクローニングサイトのMluI-Hind III切断サイト領域に挿入することにより行われる。より強い誘導能を示すクローンを得るには、これらの領域及びレポーター遺伝子を直線上に有するプラスミドをタンデムに複数個、より好ましくは5個以上、特に好ましくは5～10個連結したDNAを用いるのが好ましい。

本発明においては、このDNA (a) をヒト培養細胞に導入する。導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法により行うのが好ましい。

用いられるヒト培養細胞としては、HepG2、LS174T、Hela、Caco-2等が挙げられるが、HepG2、LS174Tが特に好ましい。DNA (a) を保持している形質転換細胞の選択は、継代培養した後のレポーター遺伝子発現量を測定すればよい。

このように継代培養してもDNA (a) を保持してなる形質転換ヒト培養細胞を用いる場合には、この形質転換ヒト培養細胞を薬物含有培地で培養し、レポーター遺伝子の発現量を測定することにより、被検薬物投与時のヒトCYP3A誘導能が測定できる。

非ヒト動物におけるレポーター遺伝子発現量の測定は、例えばウイルス (A) 及び (B) 投与、2～5日後に肝臓、脾臓等の臓器中のレポーター活性を測定することにより行われる。例えば肝臓のレポーター活性は、摘出した肝臓をホモジネートし、その遠心上清のレポーター活性、例えば蛍光強度、レポーター酵素活性等を測定することにより行われる。

ヒト培養細胞におけるレポーター遺伝子発現量の測定は、例えばウイルス (A) 及び (B) 導入2～4日後に、培養細胞をホモジネートし、その遠心上清のレポーター活性を測定することにより行われる。

得られたレポーター活性を、被検薬物非投与群又は被検薬物非含有培地培養群のそれと対比することにより、被検薬物投与によりヒトCYP3A誘導能が評価でき

る。ウイルス（A）及び（B）を用いる本発明測定系のうち、非ヒト動物を使用したin vivo系が特に好ましい。

実施例

次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

実施例 1

A. 実験方法

（1）ウイルス（A）の作製

本組換えアデノウイルスの作製にあたり、まず、CYP3A4遺伝子上流(-362 to +11)をPCR法により単離し、制限酵素Bgl II、Hind IIIで処理した後に、プロモーターを持たないホタルルシフェラーゼベクターpGL3-Basicに挿入したpGL3-CYP3A4-362を作製した。次に、さらにCYP3A4遺伝子上流dNR-1およびMajor Inducible Element (MIE)を含む領域(-7836 bp to -7208 bp)をPCRにより単離サブクローニングした後、pGL3-CYP3A4-362のBgl IIおよびXba Iサイトに挿入し、pGL3-CYP3A4-362-7Kを作製した。このpGL3-CYP3A4-362を制限酵素Xmn Iで平滑に切断して、コスミドベクターpAxcwをSwa Iにより平滑に切断した部位に組み込んだ。このインサートを持つコスミドベクターと制限酵素処理済みアデノウイルスDNA-TPCを293細胞へ同時に導入し、細胞内での相同組換えにより、目的のウイルス（A）(AdCYP3A4-362-7K)を作製した(図1)。また、AdCYP3A4-362ウイルスも作製したが、これは先に述べた-7836 bpから-7208 bpを含まないウイルスである。

（2）ウイルス（B）の作製

hPXR遺伝子をヒト肝cDNAライブラリーからPCRによりクローニングし、CMVプロモーターをもつプラスミドpCMV4のBam HI、Hind IIIサイトに挿入した(pCMV4-hPXR)。このプラスミドをSca Iにより平滑に切断し、以下、前述のウイルス（A）と同様の手順により、ウイルス（B）(AdhPXR)の作製をおこなった(図

2)。

(3) in vitroアッセイ

実験は図3に示したようにおこなった。すなわち、細胞を1ウェルあたり 2.0×10^5 で24ウェルプレートに播き、翌日に薬物処理、翌々日にウイルス感染をおこない、ウイルス感染48時間後に細胞を回収した。回収した細胞はReporter Lysis Buffer (RLB) を用いて溶解し、その細胞溶解液を用いてルシフェラーゼ活性の測定をおこなった。

(4) in vivoアッセイ

ウイルスの投与法は、当初尾静注を検討したが、ウイルスの毒性のために投与後数時間で死亡するケースが見られた。そのため投与経路を腹腔内投与に変更し急性毒性を回避した。薬物はコーン油に懸濁し、100mg/kgの用量で腹腔内にウイルス投与前日、4時間前、翌日の3回投与した。動物をウイルス投与2日後に解剖して臓器を摘出し、ホモジナイズ後 $9000 \times g$ にて延伸しその上清(S-9)を用いてルシフェラーゼ活性の測定をおこなった(図4)。

B. 実験結果

図5に、AdCYP3A4-362ウイルスを用いて培養細胞での薬物によるCYP3A4の誘導をルシフェラーゼ活性で示した。デキサメサゾン、リファンピシンおよびクロトリマゾールはDMSOに溶解し、 $10 \mu M$ の濃度で培地に添加した。これらの薬物をヒトに投与した場合、何れもCYP3A4の誘導を引き起こすことが知られているが、中でもリファンピシンは種特異性が高く、代表的なヒト型CYP3A4誘導剤として知られている。一方、デキサメサゾンは、ラットで強いCYP3A分子種の誘導を引き起こすことが知られている。

ヒト肝ガン由来培養細胞ではルシフェラーゼ活性の上昇がクロトリマゾールおよびデキサメサゾン処理によって認められたが、リファンピシン処理ではその作用は観察されなかった。その上昇レベルはクロトリマゾールで約8倍、デキサメサゾンで約2倍であった。

図6に、ウイルス（A）（AdCYP3A4-362-7K）を用いて、AdCYP3A4-362ウイルスと同じ条件で行ったin vitroレポーターアッセイの結果を示した。デキサメサゾンではほとんど誘導はみられなかったが、クロトリマゾールで強い(21倍)誘導応答がみられ、AdCYP3A4-362ウイルスではみられなかったリファンピシンによるルシフェラーゼの活性上昇がみられた(5倍)。これにウイルス（B）（AdhPXR）によりhPXRを強発現させたところ、薬剤無処置の細胞でも10～30倍のルシフェラーゼ活性の上昇がみられた。さらに薬物処理による誘導も増強され、デキサメサゾンでのルシフェラーゼ活性の上昇は3倍であったが、リファンピシンとクロトリマゾールはそれぞれ15倍、60倍とウイルス（B）（AdhPXR）非感染群よりも強く転写活性化された。

次にddY系雄性マウスを用いて、in vivoでの誘導評価検討を行った。薬物は100mg/kgの用量で1日1回3日間腹腔内投与した。2回目の薬物投与後4時間に、まず、AdCYP3A4-362ウイルスを腹腔内に投与し、2日後に肝臓重量、肝臓中のルシフェラーゼ活性およびテストステロン6 β -水酸化活性を測定した。デキサメサゾン、リファンピシンおよびクロトリマゾールはコーン油に懸濁して使用した。マウス肝臓S-9中のルシフェラーゼ活性が全ての誘導剤投与によって上昇し、その活性上昇はコントロールに対してデキサメサゾンおよびリファンピシンで約5倍、クロトリマゾールでは約9倍であった。また、肝臓の相対重量増加およびテストステロン6 β -水酸化活性の上昇がいずれの誘導剤処理群においても認められた。誘導剤処理したマウス肝臓におけるテストステロン6 β -水酸化活性とルシフェラーゼ活性上昇とはよく相関していた(図7)。

培養細胞においてウイルス（A）（AdCYP3A4-362-7K）とウイルス（B）（AdhPXR）の共感染で薬物により誘導が認められていることから、これを感染させてAdCYP3A4-362ウイルスとウイルス（A）（AdCYP3A4-362-7K）のクロトリマゾールによる誘導の強弱を検討したところ、細胞での結果と同様にウイルス（A）（AdCYP3A4-362-7K）感染マウスでより高い転写活性化が認められ、その誘導率は

細胞の場合よりも著しいものであった(1000倍)(図8)。

次に、ウイルス(A)(AdCYP3A4-362-7K)とウイルス(B)(AdhPXR)を同時に投与して、リファンピシンによる誘導とPXR強発現による影響を検討した。ウイルス(B)(AdhPXR)非投与群には投与ウイルス量を合わせるために、コントロールウイルスとしてAxCALacZを投与した。その結果リファンピシンでコントロールウイルス群(約9倍)に対し、ウイルス(B)(AdhPXR)併用で非常に高い(約320倍)転写活性化がみられ、ヒトPXRを発現させることによりマウス肝臓において、リファンピシン投与によるヒト型のCYP3A4誘導を見ることが可能となった(図9)。さらに、デキサメサゾン、リファンピシン、クロトリマゾールの誘導剤としての作用を比較するために、ウイルス(AdCYP3A4-362-7K)とウイルス(B)(AdhPXR)をマウスに共感染させ、3種の誘導剤を同時に検討した。リファンピシンは他の二つに比べその誘導は若干弱いものの、何れも強い誘導がみられた(図10)。

実施例 2

(1) 安定発現株の単離

PCR法によりヒトゲノミックDNAからCYP3A4の5'-フランキング領域+15から-362 bpおよび-7208bpから-7836bpまでを増幅単離し、図11に示したpGL3-Basic vectorの制限酵素サイトに挿入してpCYP3A4-362-7Kを作成した。pCYP3A4-362-7KをBamH Iで制限酵素処理を行い直線化した。ネオマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドBFPを同様にBgl II処理した。pCYP3A4-362-7KとBFPをそれぞれ5:1の割合でライゲーションした。このpCYP3A4-362-7KとBFPのコンストラクトをHepG2細胞にリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクトした。この際、安定発現株のセレクションのマーカースとしてゲネチシンを用いたが、このゲネチシンの最適濃度を決定するためにあらかじめ予備実験を行った。この結果よりゲネチシンの濃度を900 μ g/mlにしてセレクションを行った。トランスフェクトしてから14日後、生成したコロニーを一つずつ24ウェルプレートに移し、ゲネチシンのないメディウム中で更に1週間インキュベートした。このコロニーを適量のメディウムを入

れたエッペンドルフチューブにとり、ピペッティングで懸濁し、新しい24ウェルプレート2枚に移した。上記の24ウェルプレートがコンフレントになったところでルシフェラーゼ活性(誘導剤処理せず)を測定した。この時点で活性が現れたのは48コロニー中8コロニーだった。活性が現れたコロニーについて、10cmディッシュを用いゲネチシンのないメディウム中で継代した。リファンピシン、クロトリマゾールを誘導剤として処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、これらの細胞のストックも作成した。

(2) 細胞培養条件

24ウェルプレートに 1.0×10^5 /wellで細胞をまく。翌日、誘導剤の入ったメディウムに交換し、更に24時間インキュベートする。誘導剤はDMSOにて希釈し、最終濃度が $10 \mu\text{M}$ となるよう添加した後、2日間培養しルシフェラーゼ活性を測定した。

(3) 細胞の溶解

培地を取り除き、PBSにて洗浄する。適量のPBSを加え、細胞を剥がして回収した。4℃、15,000rpmで5分間遠心し、上清を取り除いた後、Reporter Lysis Buffer (Promega)を100ml加え、十分に攪拌した後、-80℃で6時間以上保存した。

(4) ルシフェラーゼ活性の測定

凍結した細胞溶解液を室温で溶解し、4℃、15,000rpmで5分間遠心した。上清20 μl にLuciferase assay system (Promega)を35 μl 加えてTurner Desingns Luminometer Model TD-20/20 (Promega)を使用して行った。

測定条件 Delay time:3sec

Integrate time:60sec

Sensitivity:60.1%

得られた値はタンパク定量(Bradford法)を行い、タンパク量で補正した。結果を図12に示す。

その結果、安定に継代培養できる形質転換細胞を用いて、種々の薬物によるヒ

トCYP3A誘導能がin vitroで測定できることがわかった。

産業上の利用可能性

本発明方法によれば、ヒトに被検薬物を投与したときのヒトCYP3A誘導能が簡便かつ正確に評価できることから、当該薬物の有効性、副作用の発現、薬効の消失等が正確に評価できる。

請求の範囲

1. 被検薬物を投与された非ヒト動物又は被検薬物含有培地で培養されたヒト培養細胞に、(A) アデノウイルスベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるウイルス、及び(B) アデノウイルスベクターにヒトPXR遺伝子を組み込んでなるウイルスを導入し、当該非ヒト動物又はヒト培養細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を測定することを特徴とする、被検薬物投与時のヒトCYP3A誘導能の測定法。

2. (a) プラスミドベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるDNAを導入してなる形質転換ヒト培養細胞を、被検薬物含有培地で培養し、レポーター遺伝子の発現量を測定することを特徴とする、被検薬物投与時のヒトCYP3A誘導能の測定法。

3. (A) アデノウイルスベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるウイルス、及び(B) アデノウイルスベクターにヒトPXR遺伝子を組み込んでなるウイルスを含有することを特徴とするヒトCYP3A誘導能測定試薬。

4. (a) プラスミドベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるDNAを導入してなる形質転換ヒト培養細胞を含有することを特徴とするヒトCYP3A誘導能測定試薬。

図 1

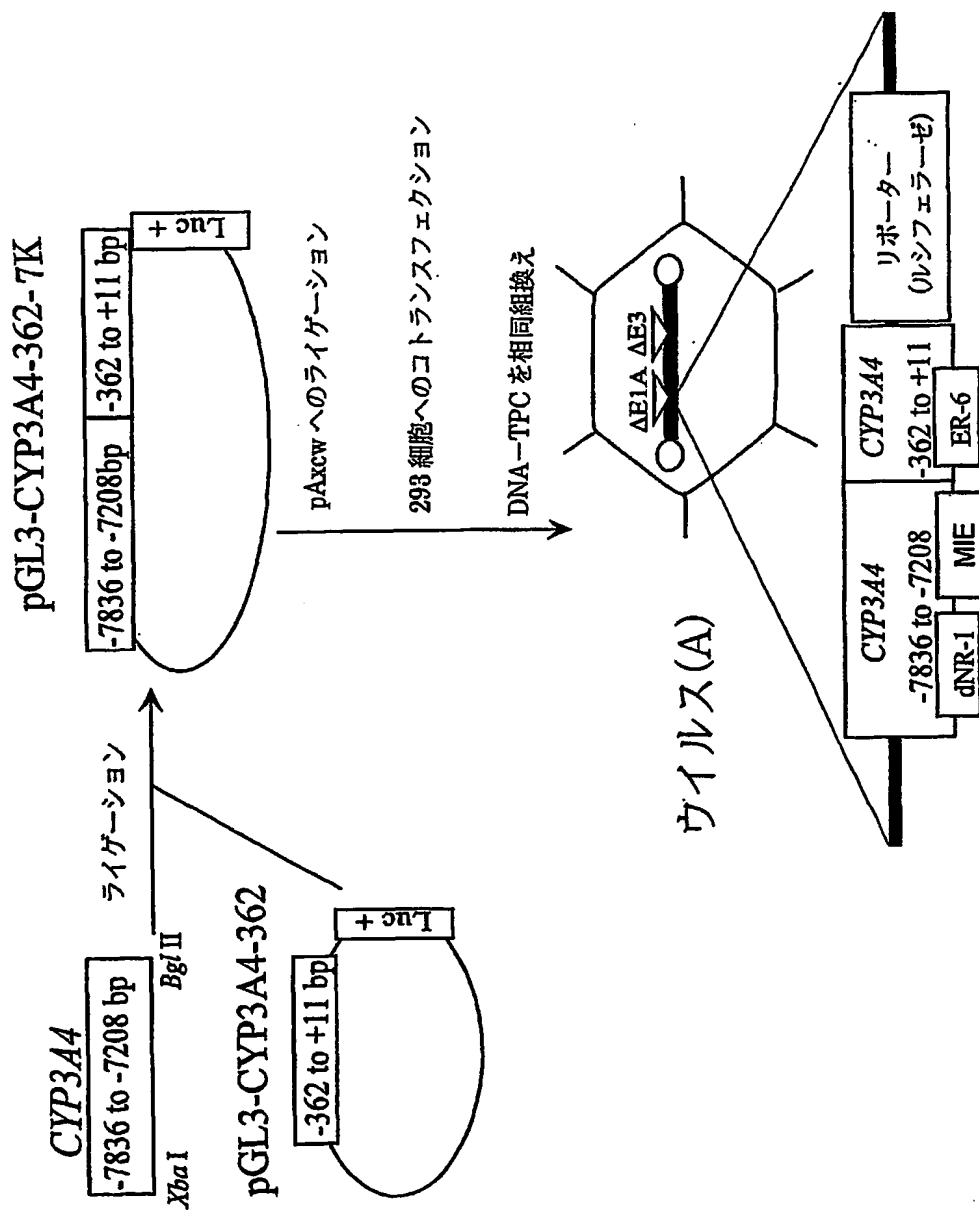


図 2

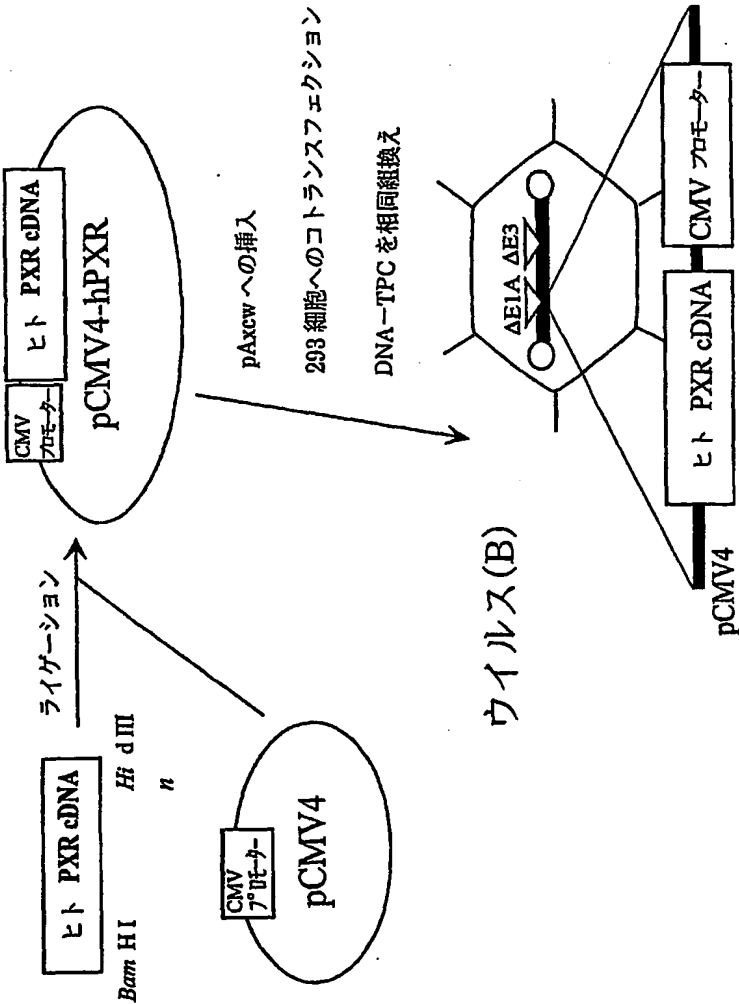


図 3

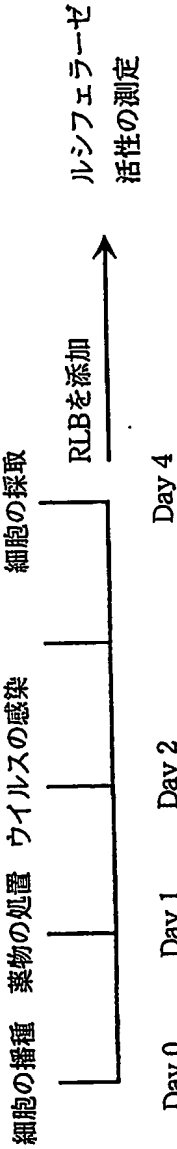


図 4

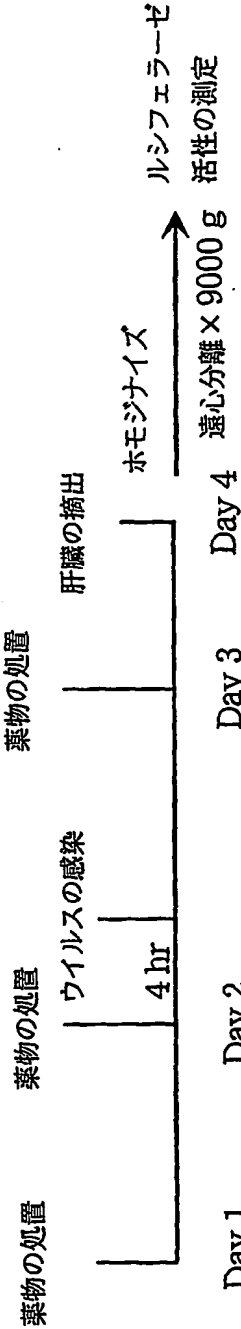


図 5

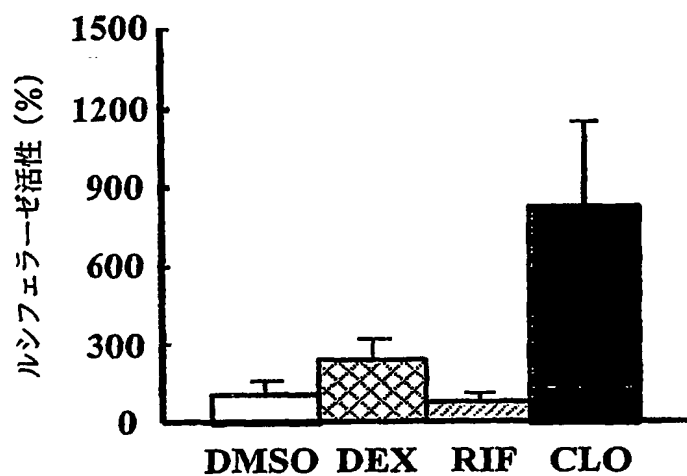


図 6

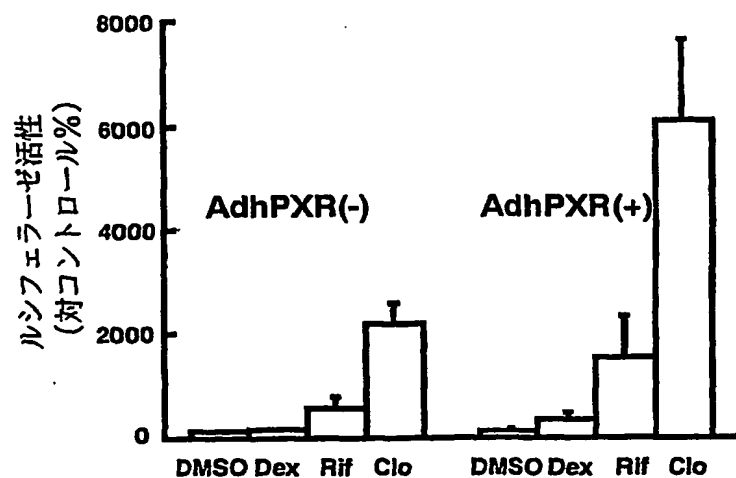


図 7

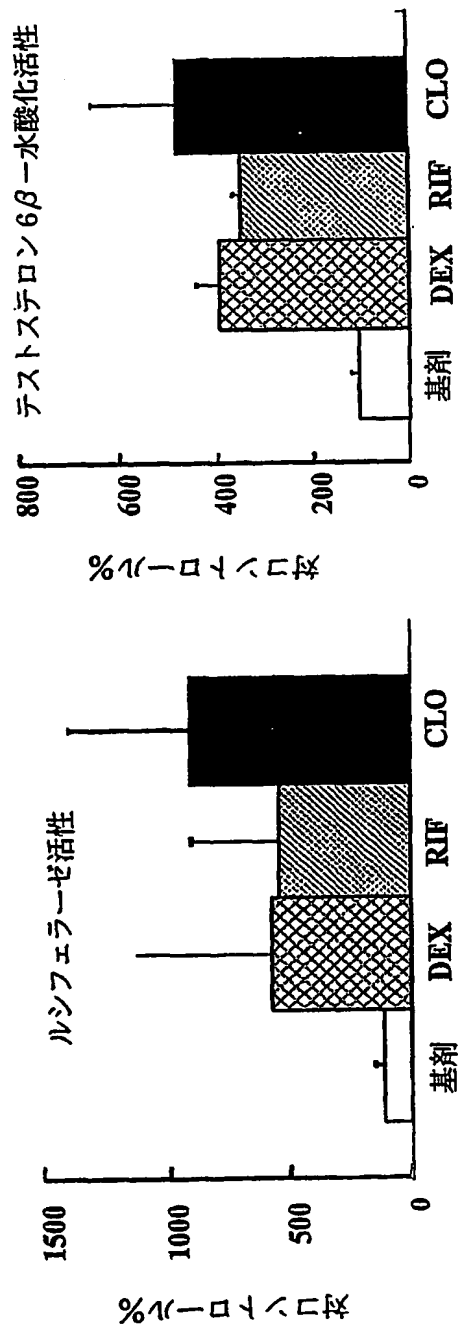


図 8

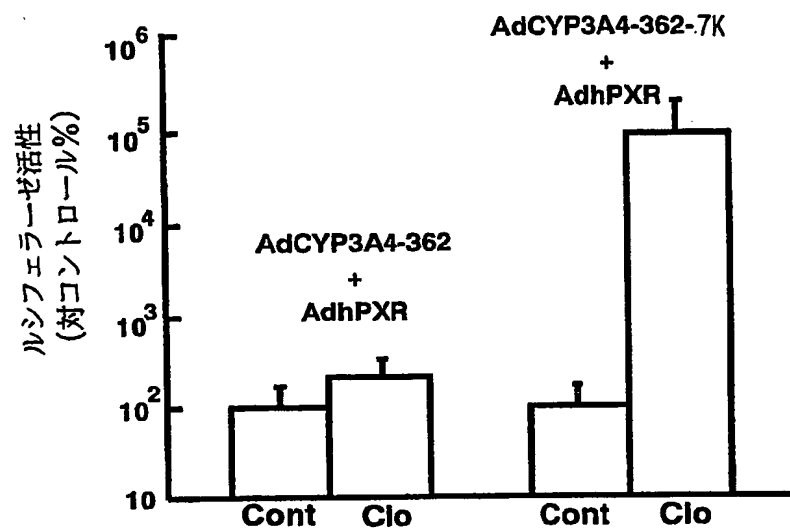


図 9

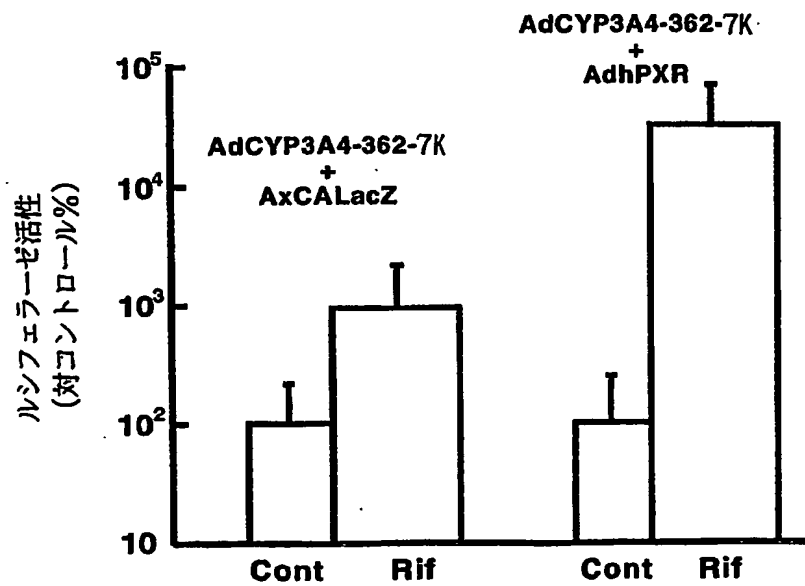


図 10

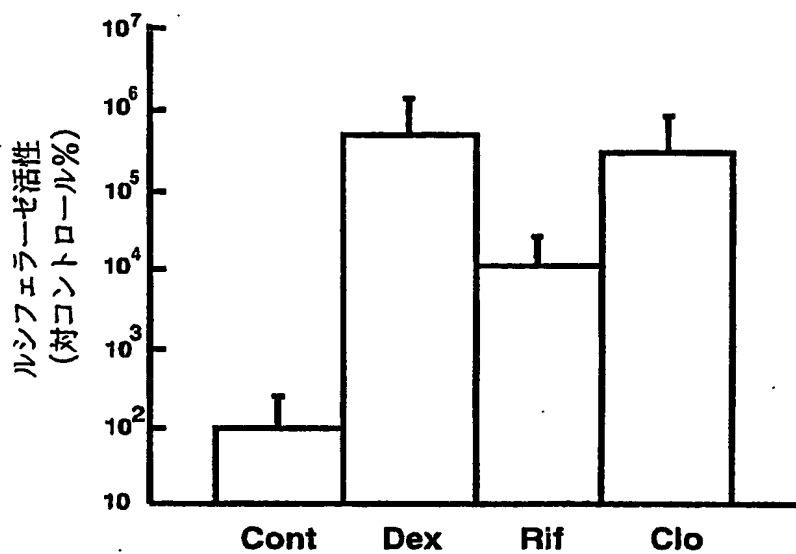


図 1 1

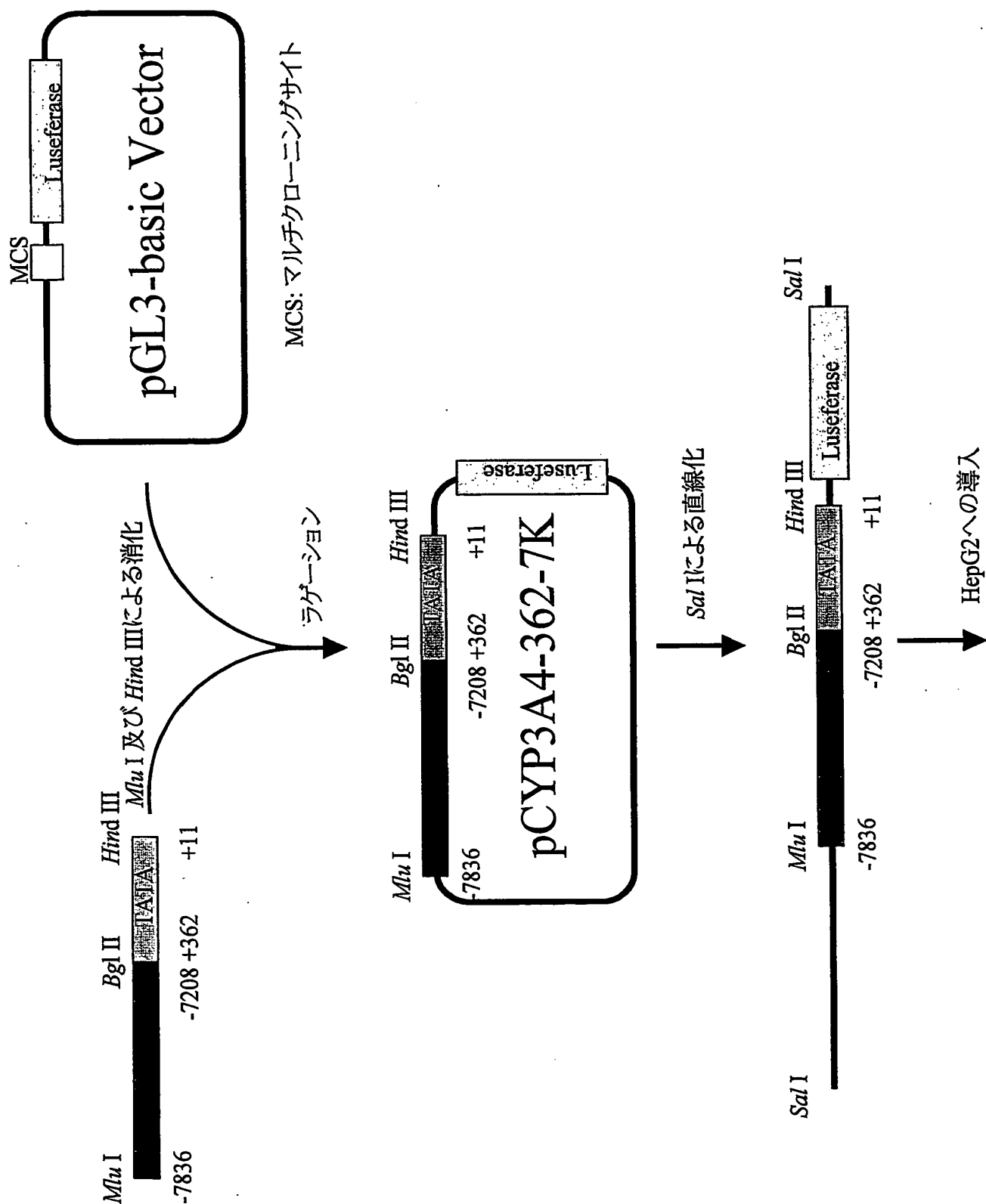
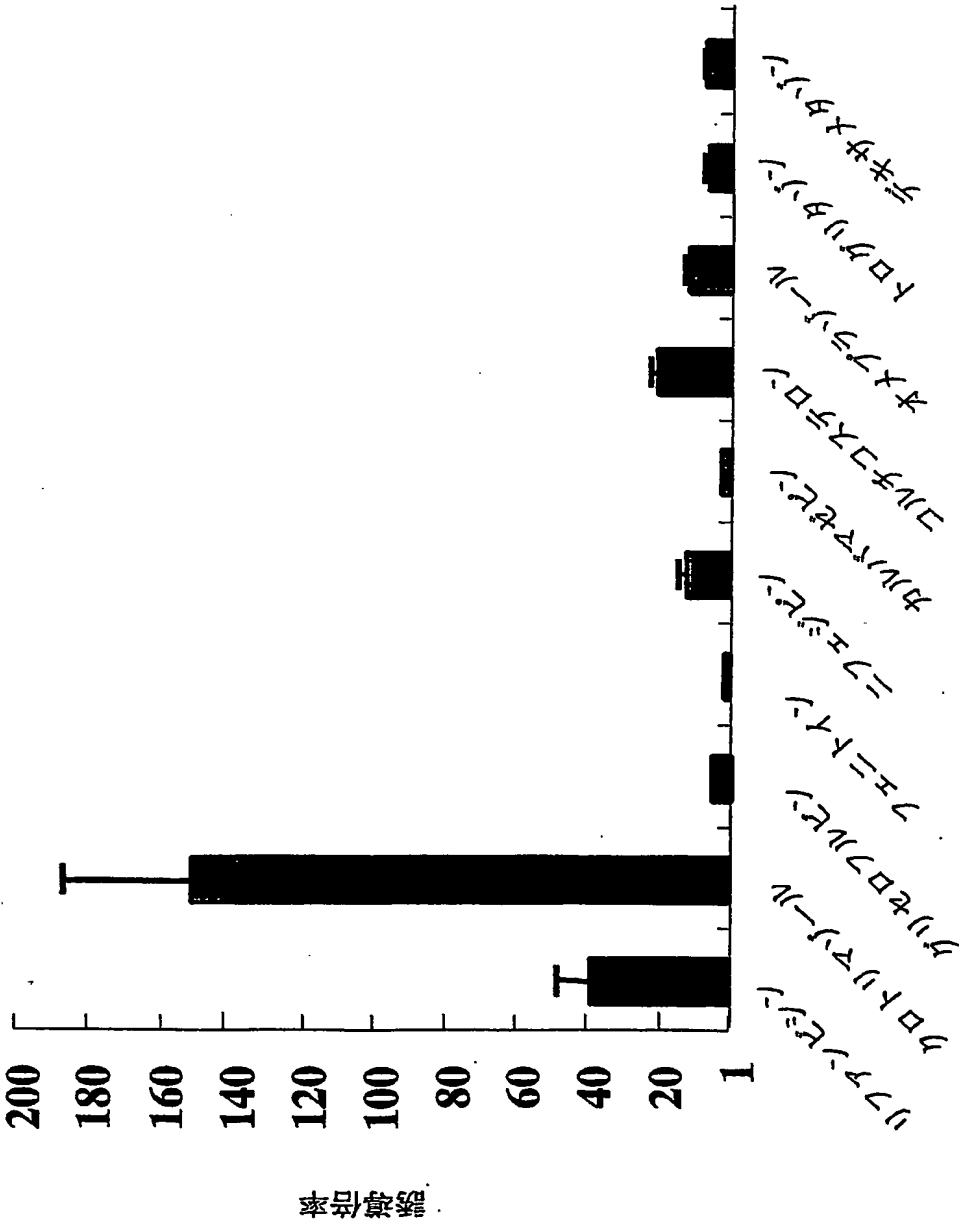


図 1 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yasushi YAMAZOE, "Yakubutsu Taishano no Kojinsa no Gen'in to naru Kakunai Tensha Chosetsukei no Kaiseki to sono Yosoku", Uehara Kinen Seimei Kagaku Zaidan Kenkyu Hokokushu, (2001), Vol.15, pages 108 to 109	1-4
X	K. NAGATA et al., Molecular Mechanism of Human CYP3A4 Induction., Xenobio. Metabol. and Dispos. (2001), Vol.16, No.5, pages 485 to 490	1-4
X	FURUKAWA, M. et al., Adenovirus vector-mediated reporter system for in vivo analyses of human CYP3A4 gene activation., J.Biochem.(Tokyo), (2002 January), Vol.131, No.1, pages 71 to 78	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 06 May, 2003 (06.05.03)	Date of mailing of the international search report 20 May, 2003 (20.05.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04761

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Goodwin B. et al., The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module., Mol.Pharmacol., (1999), Vol.56, No.6, pages 1329 to 1339	1-4
A	Pascussi JM. et al., Evidence for the presence of a functional pregnane X receptor response element in the CYP3A7 promoter gene., Biochem.Biophys. Res.Communi., (1999), Vol.260, No.2, pages 377 to 381	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/09, C12Q1/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/09, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	山添康, 薬物代謝能の個人差の原因となる核内転写調節系の解析とその予測, 上原記念生命科学財団研究報告集 (2001), Vol. 15, p. 108-109	1-4
X	K. NAGATA, et. al., Molecular Mechanism of Human CYP3A4 Induction., Xenobio. Metabol. and Dispos. (2001), Vol. 16, No. 5, p. 485-490	1-4
X	Furukawa M, et. al., Adenovirus vector-mediated reporter system for in vivo analyses of human CYP3A4 gene activation., J Biochem (Tokyo) (2002 Jan), Vol. 131, No. 1, p. 71-78	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.05.03

国際調査報告の発送日

20.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 美葉子

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Goodwin B, et. al., The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module., Mol Pharmacol. (1999), Vol. 56, No. 6, p. 1329-1339	1 - 4
A	Pascussi JM, et. al., Evidence for the presence of a functional pregnane X receptor response element in the CYP3A7 promoter gene., Biochem Biophys Res Commun. (1999), Vol. 260, No. 2, p. 377-381	1 - 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.